

## Identificación de genes asociados con Nefropatía Diabética regulados por miRNAs: Análisis *in silico*.

Rogelio Frank Jiménez-Ortega<sup>1,4\*</sup>, José Eduardo Justo-Frausto<sup>2</sup>, Juan Fernando Montes-García<sup>2,3</sup>, Irene Alva-Partida<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Dirección de la Unidad de Ciencias de la Salud, Universidad de Ecatepec; <sup>2</sup>Unidad Académica Profesional Acolman, Universidad Autónoma del Estado de México; <sup>3</sup>Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México; <sup>4</sup>Universidad Estatal del Valle de Ecatepec, Ciencias de la Acupuntura.

### ABSTRACT

#### Identification of genes associated with Diabetic Nephropathy regulated by miRNAs: *In silico* analysis.

**Introduction.** Albuminuria greater than 300mg/dL/24h (A1-300mg/g) is a characteristic of diabetic nephropathy (DN), which can trigger the development of advanced chronic kidney disease (ACKD).

**Objective.** Identify genes regulated by miRNAs that are associated with DN through an *in-silico* analysis.

**Material and methods.** Through the use of microarrays and bioinformatic analysis, potential miRNA target genes were identified: hsa-miR-126-3p, miR-320a-3p, and miR-1288-3p. These genes were subjected to signaling pathway analysis to identify processes associated with DN pathogenesis.

**Results.** 57 target genes were identified from the analyzed miRNAs, which were associated with 14 genetic ontologies and 7 KEGG signaling pathways. These results allowed the generation of an *in-silico* model showing an interaction network between target genes regulated by miRNAs whose alteration can lead to the development of ND.

**Conclusions.** In the *in-silico* model, the network of interactions found between target genes regulated by miRNAs could contribute to the understanding of the DN mechanism, opening the panorama for new research on genes and miRNAs that could be evaluated as markers in the early detection of DN.

### RESUMEN

**Introducción.** Albuminuria superior a 300 mg/dL/24h (A1-300mg/g) es una característica de la nefropatía diabética (ND), lo que puede desencadenar en el desarrollo de enfermedad renal crónica avanzada (ERCA).

#### Historial del artículo

Recibido: 24 jul 2022

Aceptado: 29 nov 2022

Disponible en línea: 1 may 2023

#### Palabras clave

Nefropatía, Diabetes, miRNAs, Genes, Microarreglos, Bioinformática.

#### Keywords

Nephropathy, Diabetes, miRNA, Genes, Microarrays, Bioinformatics

Copyright © 2023 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la *Creative Commons* (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

\*Autor para correspondencia:

Dr. Rogelio Frank Jiménez Ortega, Unidad de Ciencias de la Salud, Universidad de Ecatepec. Vía Morelos No. 25, San Juan Alcahuacan, 55040 Ecatepec de Morelos, Estado de México, México. E-mail: rfrankjo@gmail.com <https://revistabiomedica.mx>.

**Objetivo.** Identificar genes regulados por miRNAs asociados con ND a través de un análisis *in silico*.

**Materialy Métodos.** A través del uso de microarreglos y análisis bioinformáticos se identificaron potenciales genes blancos de los miRNAs; hsa-miR-126-3p, miR-320a-3p y miR-1288-3p. Estos genes fueron sometidos a un análisis de vías de señalización para identificar procesos asociados con la patogénesis de la ND.

**Resultados.** Se identificaron 57 genes blanco de los miRNAs analizados, los cuales fueron asociados con 14 ontologías genéticas y 7 vías de señalización KEGG. Estos resultados permitieron generar un modelo *in silico* en el que se muestra una red de interacción entre genes blanco regulados por miRNAs cuya alteración puede conducir al desarrollo de la ND.

**Conclusiones.** En el modelo *in silico* la red de interacciones encontradas entre genes blanco regulados por miRNAs podrían contribuir a la comprensión del mecanismo de la ND abriendo el panorama para realizar nuevas investigaciones sobre genes y miRNAs que podrían ser evaluados como marcadores en la detección temprana de la ND.

## INTRODUCCIÓN

La ND es la principal causa de enfermedad renal crónica (ERC) y de enfermedad renal crónica avanzada (ERCA). Se caracteriza por la excreción patológica de A1-300mg/g, pérdida de la tasa de filtración glomerular (TFG) y lesiones glomerulares inducidas por diabetes (1). Una de las principales complicaciones de la ND al igual que otras enfermedades crónicas no transmisibles, es su diagnóstico tardío, debido a la ausencia de síntomas en estadios tempranos. El diagnóstico definitivo de la ND puede llegar a requerir de un análisis histológico de biopsias renales. Sin embargo, en este tipo de intervenciones es complicado obtener muestra suficiente y no es apropiada para procedimientos repetidos. Por otro lado, diferentes moléculas como las proteínas de colágeno (COL4A3, COL4A4 y COL4A5), el propéptido COOH-terminal del COL4A4 y el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR1/2) se han propuesto como potenciales

marcadores para el diagnóstico temprano de la ND, aunque aún no existe evidencia de uso clínico (2). En el tratamiento de la ND, se han propuesto algunos fármacos bloqueadores del sistema renina-angiotensina, inhibidor del cotransportador de sodio-glucosa 2 y los análogos del péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) los cuales han demostrado tener efectos protectores sobre la ND. Sin embargo, ninguno ha demostrado ser del todo eficiente, por lo que en los últimos años se ha realizado la búsqueda de nuevas moléculas que puedan ser empleadas como marcadores para la detección oportuna de enfermedades renales incluida la ND. En este sentido, los micro RNAs (miRNAs), así como sus genes blancos han llamado la atención como potenciales moléculas específicas para la detección y monitoreo de distintas enfermedades metabólicas y de distintos tipos de cáncer (3). Los miRNAs son transcritos de cadena corta (~22 nucleótidos), no codificantes, que regulan de manera post-transcripcional la expresión de genes blancos y sus proteínas derivadas, a través de la degradación del mRNA o represión de la traducción (4,5). Previos estudios han demostrado que la sobre expresión de miRNAs se han relacionado con la patogénesis de la ND y se han propuesto como marcadores o dianas terapéuticas en la progresión de esta enfermedad (6–8). Sin embargo, se requieren nuevos estudios enfocados en investigar el papel de los miRNAs y la función de sus genes blancos sobre diferentes vías de señalización asociadas con la ND con el fin de conocer los procesos biológicos en que se encuentran implicados y de este modo proponer nuevas vías terapéuticas, así como nuevas moléculas que puedan ser empleadas en la detección oportuna de esta enfermedad. Por lo tanto, en este trabajo se analizó la función de genes blancos de miRNAs, su asociación con la patogénesis de la ND y su papel en diferentes vías de señalización, a través de la tecnología de microarreglos y análisis bioinformático.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Selección de los miRNAs

Este estudio consistió de una revisión sistemática de la literatura para seleccionar miRNAs candidatos en función de los siguientes criterios de inclusión:

Se consideraron aquellos miRNAs reportados en la literatura que se encontraran asociados con diabetes mellitus, enfermedades metabólicas y enfermedades renales, aquellos miRNAs sugeridos para diagnóstico de la ND reportados por al menos una publicación y los miRNAs implicados en procesos biológicos y vías de señalización asociadas con desarrollo de ND. Los miRNA seleccionados fueron: hsa-miR-126-3p (9), hsa-miR-320a-3p (6) y hsa-miR-1288-3p (10).

### **Predicción de potenciales genes blancos de miRNAs**

Para predecir los potenciales genes blancos de los miRNAs hsa-miR-126, hsa-miR-320a y hsa-miR-1288-3p, se utilizaron diferentes algoritmos basados en métodos computacionales que permiten identificar el apareamiento de bases entre la región “seed” 5’ (2–7 nucleótidos) de un miRNA con la región 3’UTR del mRNA blanco. Softwares como TargetScan se basan en la accesibilidad del sitio del gen blanco y softwares como miRanda se basan en propiedades termodinámicas que permiten filtrar los sitios de unión en la región “seed”. Otros softwares han utilizado el aprendizaje automático basado en la parametrización de datos biológicos y otras características predichas (11–13). Las bases de datos empleadas fueron: miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>), miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>), TargetScan ([http://www.targetscan.org/vert\\_80/](http://www.targetscan.org/vert_80/)) y PITA v5 0.0 ([https://tools4mirs.org/software/target\\_prediction/pita/](https://tools4mirs.org/software/target_prediction/pita/)). Los genes blancos predichos fueron seleccionados si estaban presentes en al menos 3 de las bases de datos seleccionadas, los genes blancos predichos para cada miRNA fueron fusionados en una sola lista para realizar un análisis comparativo que nos permitió seleccionar potenciales genes candidato.

### **Análisis de microarreglos de expresión**

Para seleccionar genes asociados con ND analizamos datos en formato CEL procedentes del microarreglo GeneChip Human Genome U133A de la plataforma Affymetrix, los cuales fueron obtenidos de Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) con número de acceso GSE99339. En este trabajo se analizaron los perfiles de expresión

de genes asociados con hipoxia a partir de biopsias de 200 pacientes con diferentes estadios de ERC procedentes del “European Renal cDNA Bank” en Zúrich Suiza (14).

### **Procesamiento de datos y Genes Diferencialmente Expresados (GDE).**

Para realizar el análisis de expresión diferencial, los archivos originales fueron obtenidos en formato CEL (GSE99339) y procesados en valores de expresión utilizando el método “Robust Multiarray Average” (RMA) en el entorno “R” a través de paqueterías “Affy”. Más adelante los datos a nivel sonda se transformaron utilizando R-BiocManager, seguido de la corrección de fondo y la normalización de los datos. Los criterios de corte para elegir genes sobre-expresados fueron que presentaran valores de fold-change  $< -0.5$  y  $> 0.5$ , además de un valor de “False Discovery Rate” (FDR)  $< 0.05$ .

### **Selección de potenciales genes candidato**

Los genes candidato, fueron seleccionados a través de un análisis comparativo (diagrama de Venn) entre los genes predichos para cada miRNA y los genes diferencialmente expresados del análisis de microarreglos, garantizando que los genes producto de este análisis estuvieran asociados con ND y fueran blancos predichos de los miRNA seleccionados. El conjunto de genes compartidos fue analizado por la base de datos para anotación, visualización y descubrimiento integrado (DAVID v6.8) (<https://david.ncifcrf.gov/>) en Homo sapiens para enriquecer funciones GO y vías de señalización KEGG. Los genes involucrados en estas vías de señalización fueron seleccionados para desarrollar una red de interacción a través del software Cytoscape v3.7.2.

### **Detección de Factores de Transcripción (FT)**

La unión de los FT a la región promotora de un gen determinado permite regular la expresión de uno o un conjunto de genes, alteraciones en la expresión de FT puede conducir al desarrollo de distintas enfermedades incluida la ND. Por lo tanto, para predecir los FT de genes involucrados en funciones GO y KEGG se utilizó la herramienta TfactS ([www.tfacts.org](http://www.tfacts.org)). Los FT fueron seleccionados de acuerdo con cuatro

indicadores (valor p, valor q, valor E y FDR) menores a 0.05. Los genes seleccionados fueron cargados en el analizador TfactS, posteriormente los genes blancos y los FTs fueron alineados con el fin de identificar que las expresiones estaban en la misma dirección (u opuesta) con sus regulaciones. El análisis de esta interacción se realizó a través de la construcción de una red entre el conjunto de genes seleccionados y los FTs, a través del software Cytoscape v3.7.2.

## RESULTADOS

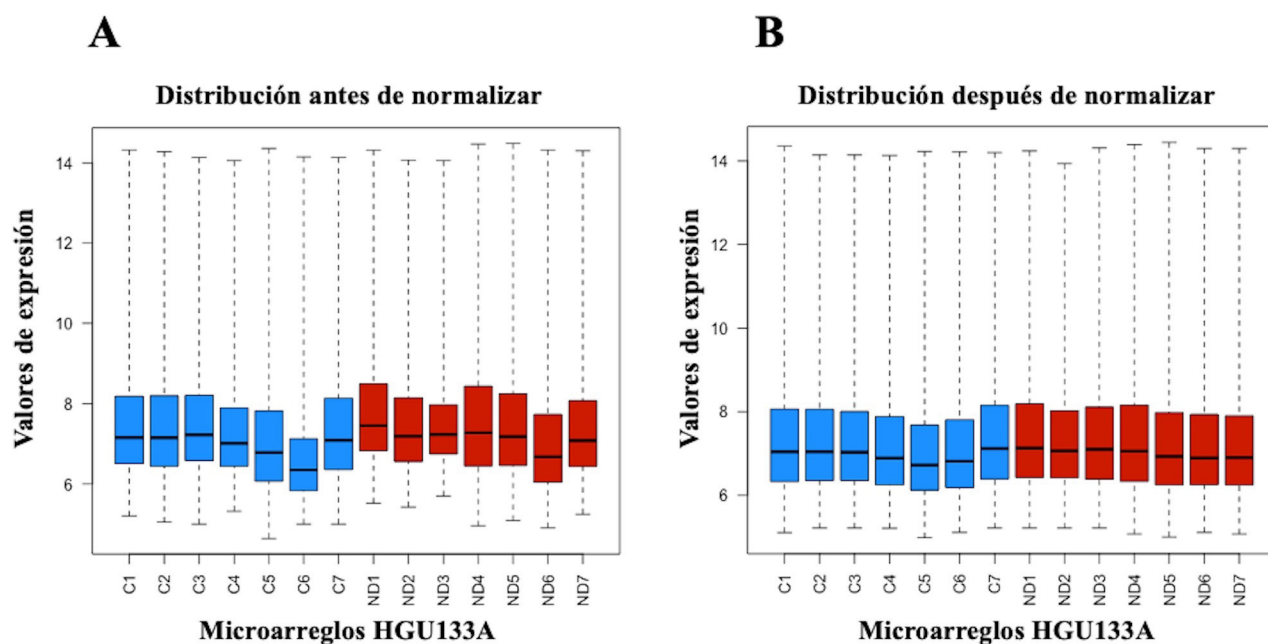
### Predicción de genes blancos de miRNAs

La predicción de genes blancos para hsa-miR-126, hsa-miR-320a y hsa-miR-1288-3p; fue consistente con la predicción de al menos tres bases de datos. En

este análisis se obtuvieron 1202 genes blancos para hsa-miR-126, 1046 genes para miR-320a y 3083 genes para hsa-miR-1288-3p.

### Procesamiento de datos GeneChip HGU133A

A través del procesamiento de los microarreglos HGU133A, se obtuvieron un total de 22,284 genes por 14 muestras. El conjunto de datos de todas las condiciones fue procesado en estimaciones de expresión utilizando el método de RMA como se muestra en el gráfico boxplot (Figura 1), las medianas de cada microarreglo muestran alto nivel de variabilidad con respecto a los datos después de la normalización lo que demuestra un excelente grado de estandarización.



**Figura 1.** Datos de distribución boxplot. El eje horizontal representa el nombre de las muestras, mientras que el eje vertical representa el valor de expresión. Las líneas negras representan la mediana que se puede utilizar para identificar el grado de estandarización. “C” representa las 7 muestras controles y “ND” representa las 7 muestras con nefropatía diabética. (A) Se muestran los datos antes de la normalización, (B) se muestran los datos después de la normalización.

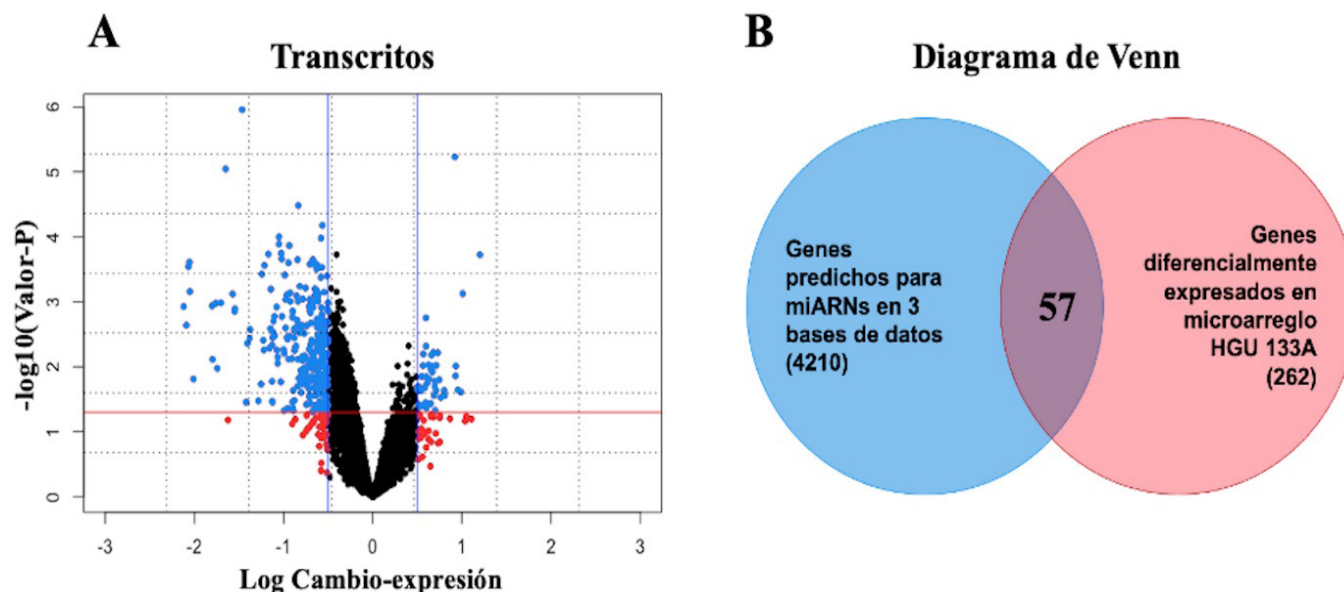
### Genes blanco de miRNAs asociados con ND

La lista de potenciales genes blanco fue vinculada con los datos derivados del análisis de expresión diferencial de los microarreglos, tomando en consideración únicamente aquellos genes que se

encontraron sub-expresados, asumiendo que un alto nivel de expresión de un miRNA corresponde a un bajo nivel de expresión de un gen blanco determinado. Una baja regulación fue definida como valores menores de  $-0.5$  FC (Figura 2A). Utilizando este criterio, se

identificaron un total de 57 genes blancos putativos para hsa-miR-126, hsa-miR-320a y hsa-miR-1288-3p. La interacción por combinación de listas de genes blancos generados por los algoritmos de predicción

para los tres miRNA y el conjunto de datos de los microarreglos de expresión se representa en la Figura 2 B.

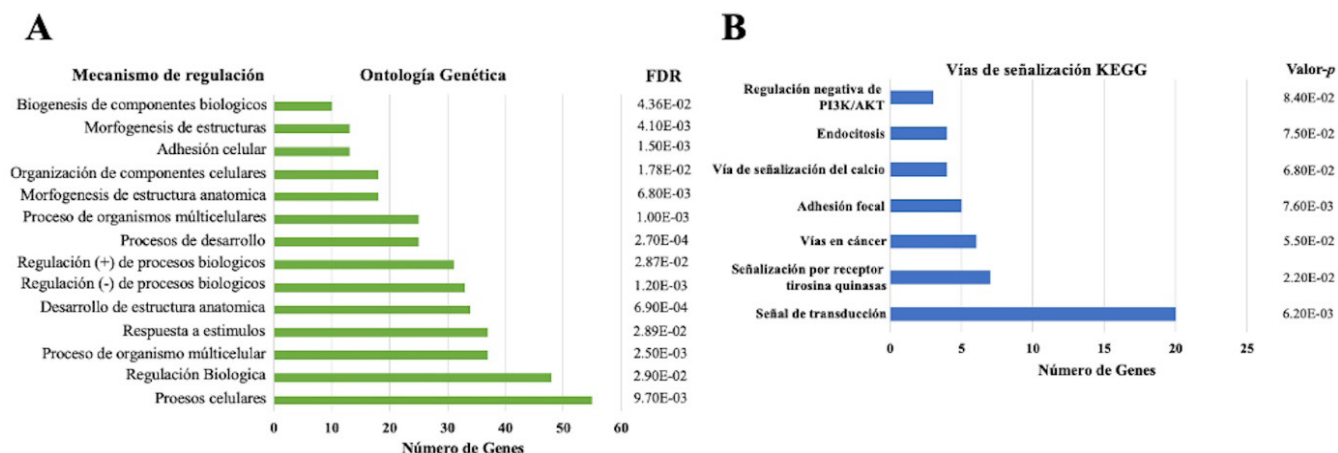


**Figura 2.** Volcano plot y diagrama de Venn. (A) Se muestran los genes diferencialmente expresados que fueron evaluados por el microarreglo de expresión HGU133A, la línea roja representa la significancia estadística ( $p = 0.05$ ), mientras que las líneas azules representan la tasa de cambio expresada en Log Fold-Change. (B) Diagrama de Venn. Muestra los criterios de selección de los posibles genes blancos de los miRNA: hsa-miR-126, hsa-miR-320a-3p y hsa-miR-1288-3p al vincular la lista obtenida de los algoritmos de predicción con los generados a partir de datos del análisis de expresión diferencial de microarreglos.

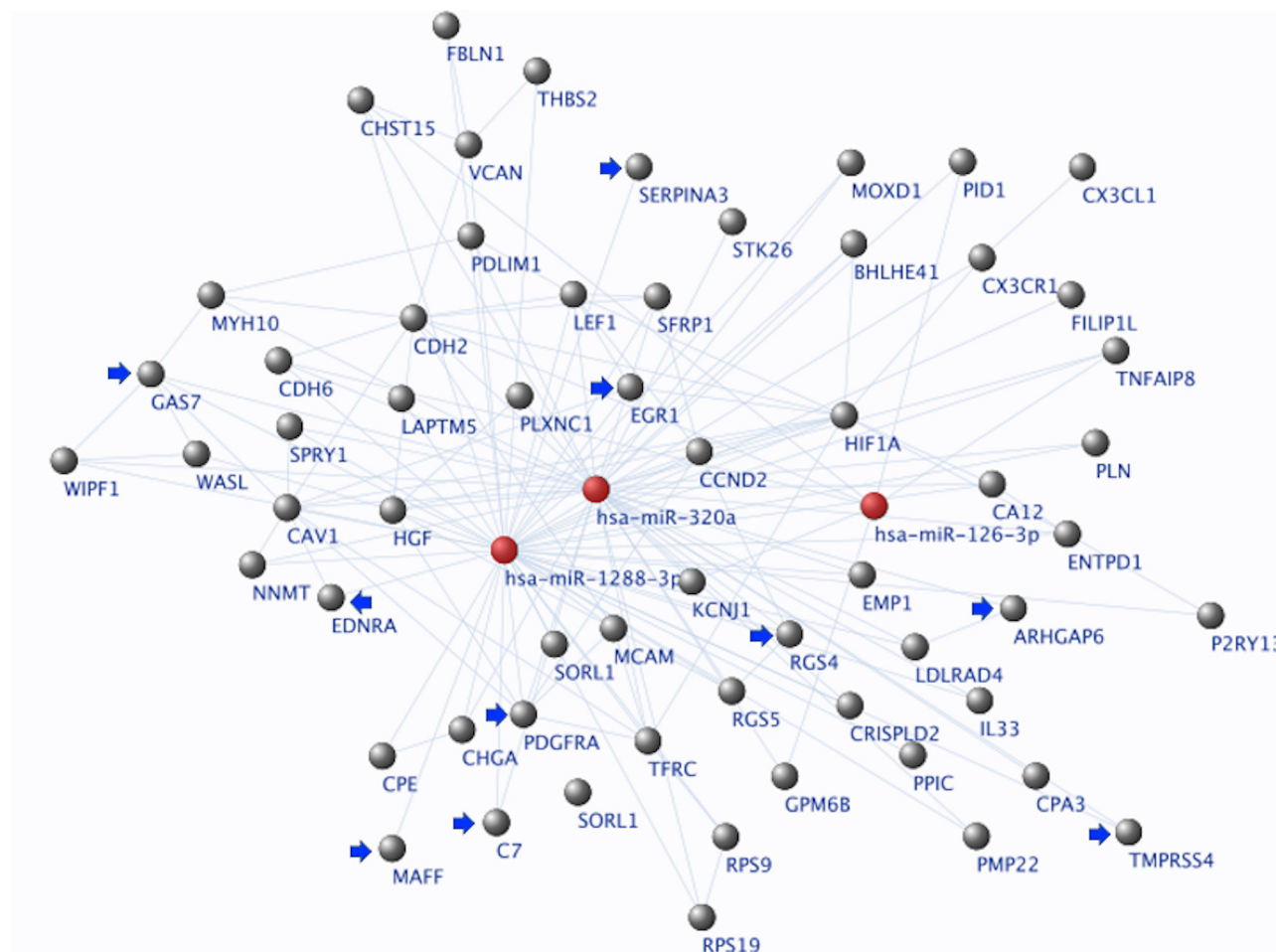
### Análisis de enriquecimiento de genes asociados con ND

Para explorar la posible asociación funcional de los miRNAs seleccionados, la lista de 57 genes fue sometida a la herramienta bioinformática DAVID v6.8 para identificar condiciones GO y posibles vías de señalización canónicas KEGG pathway. El análisis reveló 14 condiciones GO (Figura 3 A) y 7 vías de señalización KEGG (Figura 3 B) en humanos que fueron asociados con ND. De acuerdo con una extensa revisión de la literatura las condiciones GO con mayor significancia estadística fueron: Procesos celulares, Regulación biológica, Procesos de organismo multicelular, Respuesta a estímulos, Desarrollo de la estructura anatómica, Regulación

negativa de procesos, Regulación positiva de procesos biológicos. Mientras que las vías de señalización canónicas KEGG fueron: Transducción de señales, Señalización por receptor tirosina quinasa, Vías en cáncer, Adhesión focal, Vía de señalización del calcio, Endocitosis y Regulación nativa de PI3K/AKT. Los 57 genes asociados con estas vías fueron analizados por el software Cytoscape v3.7.2 para construir una red de interacción entre los miRNA y sus genes blancos. El análisis reveló que hsa-miR-126-3p se une a la región 3'UTR de 8 potenciales genes blanco, hsa-miR-320a-3p se une a 41 y hsa-miR-1288-3p se une a 47 (Figura 4), se debe tomar en cuenta que un solo miRNA puede regular a más de un gen blanco.



**Figura 3.** Procesos biológicos en términos GO y vías de señalización KEGG. (A) Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos GO de los genes putativos del análisis de los genes blancos de miRNA y el análisis de microarreglos. (B) Análisis de enriquecimiento de vías de señalización KEGG de los genes putativos del análisis de los genes blancos de miRNA y el análisis de microarreglos.

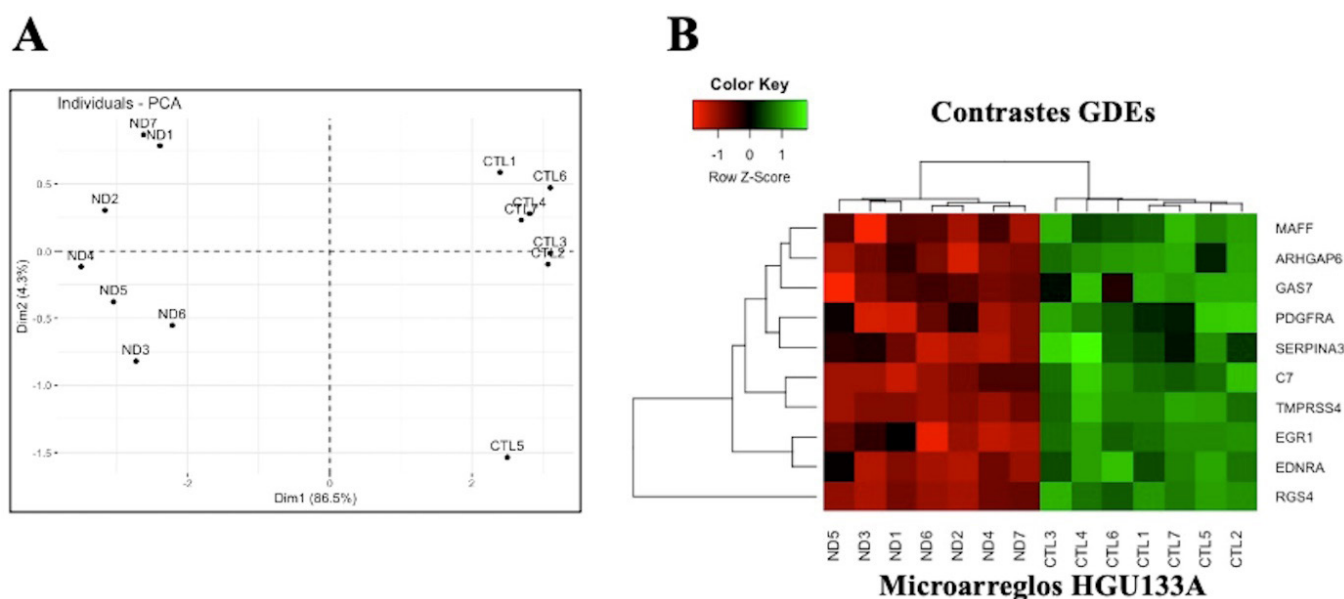


**Figura 4.** Red de interacción entre los miRNA y los genes blancos. Las flechas azules muestran la selección de 10 genes putativos que se encuentran fuertemente relacionados con la ND y que son blancos de los miRNA hsa-miR-126, hsa-miR-320a-3p y hsa-miR-1288-3p.

### Predicción y verificación de genes blancos

El análisis de la red de interacción, reveló que de los 57 genes blanco analizados, 10 genes se encuentran fuertemente asociados con el metabolismo de la ND, Proteína activadora Rho GTPasa 6 (ARHGAP6), Complemento 7 (C7), Receptor endotelial tipo A (EDNRA), Respuesta de crecimiento temprano 1 (EGR1), Proteína de arresto específico de crecimiento 7 (GAS7), Factor de transcripción F MAF BZIP (MAFF), Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA), Proteína reguladora de señalización G4

(RGS4), Miembro A familia serpina 3 (SERPINA3) y Proteasa de serina transmembrana 4 (TMPRSS4). Estos genes fueron examinados a través de un análisis de componentes principales (PCA) para distinguir el grupo de casos versus el grupo de controles. La figura 5A muestra el PCA de los 10 genes blancos de los miRNAs que fueron seleccionados y que se encuentran asociados a la ND, mientras que la figura 5B muestra un heatmap con los perfiles de expresión diferencial de estas mismas muestras. El alineamiento entre los miRNAs y los genes blancos más representativos se muestra en la Tabla 1.



**Figura 5.** PCA y heatmap de los 10 genes putativos blancos de los miRNA. (A) El eje horizontal representa las puntuaciones de los primeros componentes principales y el eje vertical representa las puntuaciones de los segundos componentes principales de las muestras. En esta figura "CTL" representa los controles (total de 7 muestras) mientras "ND" representa las muestras con Nefropatía diabética. (B). Heatmap de los 10 genes putativos seleccionados de los 14 microarreglos de expresión. Los conjuntos de datos de expresión se procesaron a través del método RMA y se observan claros perfiles de expresión diferencial.

### Detección de factores de transcripción (FT)

El análisis de identificación de FT que regulan la expresión de los 10 genes seleccionados, mostró un total de 18 FT potenciales que incluyen: Proteína delta de Unión al Potenciador CCAAT (CEBPD), Beta catenina 1 (CTNNB1), Factor de transcripción E2F1 (E2F1), Respuesta de crecimiento temprano 1 (EGR1), Factor de transcripción-ETS (ELK1), Receptor de estrógeno 1/2 (ESR1/2), Factor de transcripción ETS-1 (ETS1), Familia dedo de zinc GLI-1 (GLI1),

Factor de transcripción subunidad-Jun AP-1 (JUN), Factor nuclear Kappa beta subunidad 1 (NFKB), Caja emparejada 1 (PAX1), Protooncogen subunidad NF-KB (RELA), Factor de transcripción SP1 (SP1), Factor de respuesta sérica (SRF), Transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1), Proteína tumoral P53, (TP53) y Factor de transcripción WT1 (WT1), los valores de significancia estadística se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Sitios putativos de miRNAs en la región 3’UTR de genes blancos predichos en humanos.

Genes Blancos	miRNA	Secuencia miRNA	Región seed 3’UTR
C7	hsa-miR-1288-3p	5’ ...ACUGAGUAGCCAUACCAGUCCAC... 3’ AGAGGUCUAGUCCCGUCAGGU     	3888-3894
EDNRA	hsa-miR-1288-3p	5’ ...UGCUGCUGCUGUUACCAGUCCAA... 3’ AGAGGUCUAGUCCCGUCAGGU     	554-560 2246-2252
EGR1	hsa-miR-1288-3p	5’ ...UUUUUUUUUGAAACAGCAGUCC... 3’ AGAGGUCUAGUCCCGUCAGGU     	598-604
GAS7	hsa-miR-1288-3p	5’ ...CAGGGCUAGAGUCA - CAGUCCAG... 3’ AGAGGUCUAGUCCCGUCAGGU                          	3086-3092 2094-2100
GAS7	hsa-miR-320a-3p	5’ ...CUGGCAUCUUUCCUCAGCUAA... 3’ GGAAGAGUUGG-GUCGAAA                          	4294-4300 2952-2958 4465-4471
MAFF	hsa-miR-1288-3p	5’ ...AAGGAGACAGACCCU - GCAGUCCU... 3’ AGAGGUCUAGUCCCGUCAGGU                          	876-882
MAFF	hsa-miR-320a-3p	5’ ...CUGCCUGAGUCCAGCCCAUGGUUUUC. 3’ AGCGGG AGAGUUGG GUCGAAAA                               	1376-1398
PDGFRA	hsa-miR-1288-3p	‘ ...CCGGAUGAAACUUCUCAGUCCAG... 3’ AGAGGUCUAGUCCCGUCAGGU     	2323-2329
RGS4	hsa-miR-1288-3p	5’ ...GGUGGGACCCAUUCCAGUCCAA... 3’ AGAGGUCUAGUCCCGUCAGGU     	135-141
SERPINA3	hsa-miR-1288-3p	5’ ...AGAUAAUUGCUCUCAGCAGUCC... 3’ AGAGGUCUAGUCCCGUCAGGU     	997-1003
TMRSS4	hsa-miR-1288-3p	5’ ...GCUGCCAGGUGUGAGGCAGUCC... 3’ AGAGGUCUAGUCC - CGUCAGGU                          	993-999

*ARHGAP6*: Proteína activadora Rho GTPasa 6, *C7*: Complemento 7, *EDNRA*: Receptor endotelial tipo A, *EGR1*: Respuesta de crecimiento temprano 1, *GAS7*: Proteína de arresto específico de crecimiento 7, *MAFF*: Factor de transcripción F MAF BZIP, *PDGFRA*: Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas, *RGS4*: Proteína reguladora de señalización G4, *SERPINA3*: Miembro A familia serpina 3 y *TMRSS4*: Proteasa de serina transmembrana 4.

### Análisis de enriquecimiento de FT

La vía de interacción entre los FT identificados y los 10 genes seleccionados se muestra en la figura 6 A. El análisis de enriquecimiento mostró 337 procesos biológicos en función de vías moleculares. Los 10 principales procesos biológicos en términos GO relacionados con los FT se muestran en la figura 6B. Dentro de los procesos biológicos GO que se encuentran asociados con la ND se encuentran: GO:0072301 Regulación de la proliferación de

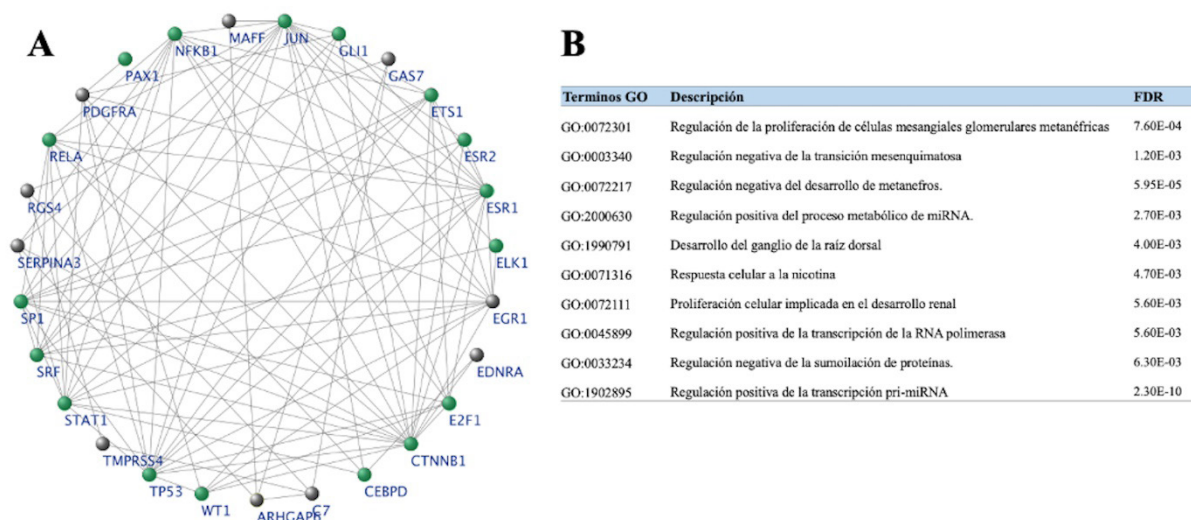
células mesangiales glomerulares metanéficas, GO:0003340 Regulación negativa de la transición mesenquimatosas, GO:0072217 Regulación negativa del desarrollo de metanefros, GO:2000630 Regulación positiva del proceso metabólico de miRNA y GO:0072111 Proliferación celular implicada en el desarrollo renal (Figura 6B).



**Tabla 2.** Factores de transcripción involucrados en la regulación de genes asociados con ND.

Factor de transcripción	Genes regulados	Valor-p	FDR
CEBPD	1	1.34E-02	1.67E-02
CTNNB1	1	1.68E-01	4.72E-02
E2F1	2	3.22E-03	8.33E-03
EGR1	2	5.23E-02	3.06E-02
ELK1	1	9.35E-03	1.39E-02
ESR1	1	3.13E-02	2.22E-02
ESR2	1	4.21E-03	5.56E-03
ETS1	1	7.74E-02	3.89E-02
GLI1	1	7.08E-02	3.33E-02
JUN	1	7.46E-02	3.61E-02
NFKB1	1	8.02E-02	4.17E-02
PAX1	1	1.17E-03	2.78E-03
RELA	1	4.48E-02	2.78E-02
SP1	1	2.28E-01	5.00E-02
SRF	1	5.27E-03	1.11E-02
STAT1	1	3.53E-02	2.50E-02
TP53	1	8.40E-02	4.44E-02
WT1	1	1.57E-02	1.94E-02

FDR: False Discovery Rate (Tasa de falso descubrimiento). *CEBPD*: Proteína delta de Unión al Potenciador CCAAT, *CTNNB1*: Beta catenina 1, *E2F1*: Factor de transcripción E2F1, *EGR1*: Respuesta de crecimiento temprano 1, *ELK1*: Factor de transcripción-ETS, *ESR1/2*: Receptor de estrógeno 1/2, *ETS1*: Factor de transcripción ETS-1, *GLI1*: Familia dedo de zinc GLI-1, *JUN*: Factor de transcripción subunidad-Jun AP-1, *NFKB*: Factor nuclear Kappa beta subunidad 1, *PAX1*: Caja emparejada 1, *RELA*: Protooncogen subunidad NF-KB, *SP1*: Factor de transcripción SP1, *SRF*: Factor de respuesta sérica, *STAT1*: Transductor de señal y activador de la transcripción 1, *TP53*: Proteína tumoral P53 y *WT1*: Factor de transcripción WT1.



**Figura 6.** Red de interacción y Análisis de procesos biológicos en términos GO. (A) Se muestra la red de interacción entre los 10 genes putativos y 18 FT. Los nodos verdes representan los FT y los nodos grises representan los genes putativos seleccionados en el análisis. (B) Se muestran los procesos biológicos en términos GO, siendo los más representativos: GO:0072301, GO:0003340, GO:0072217 y GO:2000630.

## DISCUSIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades crónicas más comunes que conducen al desarrollo de la ERCA. Este trastorno metabólico se caracteriza por hiperglicemia debido a una producción inadecuada (DMT1) o por resistencia a la insulina (DMT2). Una de las principales complicaciones microvasculares de la DM es la enfermedad renal diabética, también conocida como ND, que se observa entre el 20–40% de los pacientes que viven con diabetes (15). Actualmente, el método no invasivo más utilizado en el diagnóstico de la ND es a través de la cuantificación de la A1-300mg/g. Sin embargo, no es un predictor preciso del riesgo de la enfermedad debido a sus limitaciones, como el hecho de que no todas las personas que viven con diabetes desarrollarán ERCA, incluso algunas pueden presentar valores normales de A1-300mg/g lo que hace difícil predecir la progresión de la enfermedad (16). En este sentido, los miRNAs juegan un papel fundamental en muchos procesos biológicos y se han reportado como potenciales herramientas para el monitoreo y detección temprana de múltiples enfermedades. En la última década, los estudios de los miRNAs y sus genes blancos han revelado un prometedor potencial como moléculas para la detección temprana de diferentes enfermedades entre las que se encuentra la ND. Una de las ventajas que presentan los miRNAs sobre otras moléculas empleadas en el diagnóstico de muchas enfermedades, es su estabilidad en sistemas biológicos, debido a su pequeño tamaño y resistencia en procesos degradativos. La estabilidad de los miRNAs en comparación con otras biomoléculas como el mRNA y DNA, permite su detección y cuantificación en cantidades escasas de materiales (biopsias) y en muestras clínicas comprometidas como diferentes tipos de tejido (17). Cambios específicos en los perfiles de expresión de genes de tejido renal, sangre periférica y orina, han sido asociados al desarrollo de ND por regulación de la respuesta inflamatoria, estrés oxidativo, anormalidades metabólicas, respuesta inmune y fibrosis, a través de diferentes vías de señalización (18). Estudios previos han mencionado múltiples

genes involucrados con la ND basados en los perfiles de expresión, por ejemplo: el gen supresor de metástasis 1 (MTSS1) que desempeña un papel clave en la ND a través de su participación en la regulación de la organización del citoesqueleto y el gen de actina 4 (ACTN4) que además de participar en la acción y función del citoesqueleto, mutaciones identificadas en este gen se han observado que pueden causar glomerulosclerosis focal y segmentaria (19). Liu X *et al.* 2019, realizaron la búsqueda de genes asociados con ND a través de un análisis de datos procedentes de microarreglos de expresión en los que se analizaron los genes diferencialmente expresados entre un grupo control y un grupo con ND. Sus resultados muestran un total de 554 GDEs que, al ser sometidos a un análisis de enriquecimiento, los autores observaron que el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB1) presenta un alto índice de correlación con la ND (20). Por otro lado, Feng S *et al.*, 2021, a través de la base GEOs analizaron datos de microarreglos procedentes de muestras de biopsias de glomérulos de pacientes con ERC. Los autores identificaron variación en los perfiles de expresión de los genes: Lumican (LUM), Fibromodulina (FMOD), Elastina (ELN), Fibulina (FBLN1), Metaloproteinasa 2 (MMP2) y Fibulina 5 (FBLN5) de los cuales LUM y FMOD se mostraron sobre expresados en muestras de pacientes con ND y se correlacionaron negativamente con la tasa de filtración glomerular estimada (21).

Los GDE en su mayoría son los mismos en diferentes reportes, pero factores como el número de muestras, plataformas y métodos de análisis, podrían conducir a diferentes resultados dentro de las tecnologías empleadas. Se ha observado que la mayoría de trabajos dirigidos a la búsqueda de GDE, se concentraron en genes individuales y carecían de datos generales u otros factores que incluyen mecanismos de regulación como los miRNAs. En respuesta a esto, muchos expertos han hecho grandes avances para obtener resultados de microarreglos y otras tecnologías a través de metanálisis. Sin embargo, muchas cuestiones esenciales como la anotación y la comparación de plataformas cruzadas no se han resuelto adecuadamente. Además, existe la

necesidad de entender los mecanismos moleculares de la ND y de este modo desarrollar mejores métodos de detección, diagnóstico y búsqueda de blancos terapéuticos, que puedan mejorar el manejo clínico y generar buenos resultados para los pacientes. En este trabajo se realizó un análisis sobre miRNAs que previamente fueron asociados con el desarrollo de la ND y tienen un papel como moléculas potenciales para la detección oportuna de esta enfermedad. Los miRNAs seleccionados para este trabajo fueron reportados con niveles de expresión significativamente elevados, sugiriendo un importante papel en procesos reguladores de la ND (6,10,22). Los resultados del análisis de los microarreglos HGU133A normalizados por el método de RMA mostraron un total de 407 genes diferencialmente expresados de los cuales 327 se encontraron sub-regulados. La combinación de estos genes con la búsqueda de genes blancos para cada miRNA permitió la identificación precisa de genes directamente asociados con la ND y que fueran blancos específicos de cada miRNA, obteniendo un total de 57 genes analizados en términos GO. A través del análisis en términos GO, encontramos que los genes identificados se encontraban involucrados en procesos de regulación celular, regulación biológica, respuesta a estímulos, desarrollo de estructura anatómica, morfogénesis, adhesión celular y biogénesis, mientras que las vías de señalización KEGG mostraron la regulación negativa de la vía de señalización PI3K/AKT, la cual se ha reportado que es una vía de transducción de señalización apoptótica cuya disminución en la fosforilación podría dar lugar a la apoptosis de los podocitos (23). La vía de la endocitosis se activa a través de numerosas Rab-GTPasas en circuitos endosómicos y de autofagia, donde alteraciones por desregulación genética desequilibran la actividad de la GTPasa, alterando la fisiología celular y contribuyendo al desarrollo de patologías como la ND (24). Los podocitos permiten mantener la permeabilidad selectiva de la barrera de filtración glomerular y la integridad estructural glomerular, la disfunción de la regulación de la señalización del calcio en los podocitos conduce a la desorganización

del citoesqueleto de actina, la interrupción del diafragma de hendidura y la proteinuria (25). La patogenia de la ND está estrechamente relacionada con la acumulación de proteínas de la matriz extracelular (MEC), incluida la fibronectina, en el mesangio glomerular, lo que contribuye a la pérdida de la función renal. Las integrinas son receptores transmembrana que desempeñan un papel importante en las interacciones célula-matriz y regulan la vía de señalización de la adhesión focal celular y la transducción de señales de la MEC, las integrinas y otras proteínas asociadas, se regulan coordinadamente en respuesta a la hiperglucemia, lo que a su vez contribuye a la expansión de la matriz mesangial en pacientes con ND (26). Finalmente, la vía de señalización mediada por receptor tirosina-quinasa regula el factor de crecimiento de tipo insulina-1, participando en la hipertrofia de la producción de la MEC. El descontrol de la glicemia por la diabetes disminuye la producción de la MEC en el hígado, lo que produce una disminución del factor en la sangre y en respuesta a ello se genera una estimulación local de síntesis de este factor en tejidos no hepáticos, entre ellos el riñón (27). Los genes implicados en estas vías de señalización KEGG junto con los miRNA seleccionados fueron utilizados para formar una red de interacción, lo cual nos permitió seleccionar 10 genes candidato blancos de hsa-miR-126-3p, miR-320a-3p y miR-1288-3p. Entre esta selección encontramos al gen MAFF que previamente fue identificado como blanco de hsa-miR-320a-3p, la función de este gen está asociada con la regulación de genes antioxidantes, como: glutatión S-transferasa alfa2 (GSTA2), Quinona oxidoreductasa (NQO1) y g-glutamato cisteína ligasa (g-GCLC), sugiriendo que la regulación negativa de MAFF a través por hsa-miR-320a-3p induce estrés oxidativo y consecuentemente la disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas en la diabetes (28). Más adelante, se identificaron 18 FT que regulan la expresión de los 10 genes candidatos, mostrando su interacción en la Figura 6A. El análisis en términos GO mostró que la interacción entre los genes candidatos y los FT se encontraba fuertemente relacionada

con procesos renales, entre estos encontramos la regulación de células mesangiales glomerulares metanéficas (GO:0072301), Regulación negativa de la transición mesenquimatosas (GO:0003340), Regulación negativa del desarrollo de metanefros (GO:00722117) y Regulación positiva del proceso metabólico de miRNA (GO:2000530), lo cual confirma la eficiencia de nuestro análisis y nos permite proponer estos genes para su análisis a mayor profundidad y corroborar su asociación con la ND.

## CONCLUSIONES

Aunque muchos genes enriquecidos parecen estar altamente asociados con la ND, estos carecen de verificación biológica, este estudio proporciona información significativa para realizar pruebas de validación como RT-qPCR o construcciones con genes reporteros para validar el papel de los genes, miRNA y FT. Este análisis *in silico*, utiliza métodos estandarizados para la búsqueda de genes blancos de miRNAs y análisis de microarreglos a través del método RMA lo que permite que estos resultados puedan ser replicados.

## REFERENCIAS

- Shen Z, Fang Y, Xing T, Wang F. Diabetic Nephropathy: From Pathophysiology to Treatment. *J Diabetes Res*. 2017;2379432. DOI: 10.1155/2017/2379432.
- Colhoun HM, Marcovecchio ML. Biomarkers of diabetic kidney disease. *Diabetología*. 2018;61(5):996-1011. DOI: 10.1007/s00125-018-4567-5.
- Staitieh SA, Akil L, Al Khansa R, Nasr R, Al Sagheer Z, Houshaymi B, Merhi RA. Study of microRNA expression profiling as biomarkers for colorectal cancer patients in Lebanon. *Mol Clin Oncol*. 2022;16(2):39. DOI: 10.3892/mco.2021.2473.
- Leitão AL, Enguita FJ. A Structural View of miRNA Biogenesis and Function. *Noncoding RNA*. 2022;8(1):10. DOI: 10.3390/ncrna8010010.
- Alva I, Espinosa LI, Jiménez-Ortega RF. Biogenesis de miARN y su papel como biomarcadores en la detección de la nefropatía diabética. *Rev. ALAD*. 2022;12(1):15-25. DOI: 10.24875/ALAD.22000003.
- He M, Wang J, Yin Z, Zhao Y, Hou H, Fan J. et al. MiR-320a induces diabetic nephropathy via inhibiting MafB. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(10):3055-3079. DOI: 10.18632/aging.101962.
- Conserva F, Barozzino M, Pesce F, Divella C, Oranger A, Papale M. et al. Urinary miRNA-27b-3p and miRNA-1228-3p correlate with the progression of Kidney Fibrosis in Diabetic Nephropathy. *Sci Rep*. 2019;9(1):11357. DOI: 10.1038/s41598-019-47778-1.
- Pordzik J, Eyileten-Postuła C, Jakubik D, Czajka P, Nowak A, De Rosa S. et al. MiR-126 Is an Independent Predictor of Long-Term All-Cause Mortality in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Med*. 2021;10(11):2371. DOI: 10.3390/jcm10112371.
- Al-Kafaji G, Al-Mahroos G, Al-Muhtaresh HA, Skrypnik C, Sabry MA, Ramadan AR. Decreased expression of circulating microRNA-126 in patients with type 2 diabetic nephropathy: A potential blood-based biomarker. *Exp Ther Med*. 2016;12(2):815-822. DOI: 10.3892/etm.2016.3395.
- Raitoharju E, Seppälä I, Oksala N, Lyytikäinen LP, Raitakari O, Viikari J, et al. Blood microRNA profile associates with the levels of serum lipids and metabolites associated with glucose metabolism and insulin resistance and pinpoints pathways underlying metabolic syndrome: the cardiovascular risk in Young Finns Study. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;391(1-2):41-9. DOI: 10.1016/j.mce.2014.04.013.
- Lee YJ, Kim V, Muth DC, Witwer KW. Validated MicroRNA Target Databases: An Evaluation. *Drug Dev Res*. 2015;76(7):389-96. DOI: 10.1002/ddr.21278.
- Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS One*. 2018;13(10):e0206239. DOI: 10.1371/journal.pone.0206239.
- Quillet A, Saad C, Ferry G, Anouar Y, Vergne N, Lecroq T. et al. Improving Bioinformatics Prediction of microRNA Targets by Ranks Aggregation. *Front Genet*. 2020;10:1330. DOI: 10.3389/fgene.2019.01330.
- Shved N, Warsow G, Eichinger F, Hoogewijs D, Brandt S, Wild P, et al. Transcriptome-based network analysis reveals renal cell type-specific dysregulation of hypoxia-associated transcripts. *Sci Rep*. 2017;7(1):8576. DOI: 10.1038/s41598-017-08492-y.
- Delrue C, Speeckaert R, Delanghe JR, Speeckaert MM. The Role of Vitamin D in Diabetic Nephropathy: A Translational Approach. *Int J Mol Sci*. 2022;23(2):807. DOI: 10.3390/ijms23020807.
- Samsu N. Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Biomed Res Int*. 2021;1497449. DOI: 10.1155/2021/1497449.
- Zhao C, Zhao M, Zhu Y, Zhang L, Zheng Z, Wang Q, et al. The persistence and stability of miRNA in bloodstained samples under different environmental conditions. *Forensic Sci Int*. 2021;318:110594. doi: 10.1016/j.forsciint.2020.110594.
- Tang J, Yao D, Yan H, Chen X, Wang L, Zhan H. The Role of MicroRNAs in the Pathogenesis of Diabetic

- Nephropathy. *Int J Endocrinol*. 2019;8719060 DOI: 10.1155/2019/8719060.
19. Wang Z, Wang Z, Zhou Z, Ren Y. Crucial genes associated with diabetic nephropathy explored by microarray analysis. *BMC Nephrol*. 2016;17(1):128. DOI: 10.1186/s12882-016-0343-2.
  20. Liu X, Li X. Key Genes Involved in Diabetic Nephropathy Investigated by Microarray Analysis. *J Comput Biol*. 2019;26(12):1438-1447. doi: 10.1089/cmb.2019.0182.
  21. Feng S, Gao Y, Yin D, Lv L, Wen Y, Li Z, et al. Identification of Lumican and Fibromodulin as Hub Genes Associated with Accumulation of Extracellular Matrix in Diabetic Nephropathy. *Kidney Blood Press Res*. 2021;46(3):275-285. doi: 10.1159/000514013.
  22. Al-Kafaji G, Al-Mahroos G, Al-Muhtaresh HA, Skrypnik C, Sabry MA, Ramadan AR. Decreased expression of circulating microRNA-126 in patients with type 2 diabetic nephropathy: A potential blood-based biomarker. *Exp Ther Med*. 2016;12(2):815-822. DOI: 10.3892/etm.2016.3395.
  23. Zhang Y, Chen X, Yuan L, Zhang Y, Wu J, Guo N. et al. Down-regulation of IRAK1 attenuates podocyte apoptosis in diabetic nephropathy through PI3K/Akt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;506(3):529-535. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.09.175.
  24. Agola JO, Jim PA, Ward HH, Basuray S, Wandinger-Ness A. Rab GTPases as regulators of endocytosis, targets of disease and therapeutic opportunities. *Clin Genet*. 2011;80(4):305-18. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2011.01724.x.
  25. Ding Y, Tang X, Wang Y, Yu D, Zhu C, Yu J. Tetrandrine alleviates podocyte injury via calcium-dependent calpain-1 signaling blockade. *BMC Complement Med Ther*. 2021;21(1):296. DOI: 10.1186/s12906-021-03469-x.
  26. Guo L, Sanders PW, Woods A, Wu C. The distribution and regulation of integrin-linked kinase in normal and diabetic kidneys. *Am J Pathol*. 2001;159(5):1735-42. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63020-9.
  27. Meza Letelier CE, San Martín Ojeda CA, Ruiz Provoste JJ, Frugone Zaror CJ. Fisiopatología de la nefropatía diabética: una revisión de la literatura. *Medwave*. 2017;17(1):e6839. DOI: 10.5867/medwave.2017.01.6839.
  28. Du H, Yin Z, Zhao Y, Li H, Dai B, Fan J, et al. miR-320a induces pancreatic  $\beta$  cells dysfunction in diabetes by inhibiting MafF. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2021;26:444-457. DOI: 10.1016/j.omtn.2021.08.027.